



TITLE:

イネ転移因子mPing挿入を利用した環境ストレス応答性の改変(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

安田, 加奈子

CITATION:

安田, 加奈子. イネ転移因子mPing挿入を利用した環境ストレス応答性の改変. 京都大学, 2015, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19030>

RIGHT:

許諾条件により本文は2016/03/31に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	安田 加奈子
論文題目	イネ転移因子 <i>mPing</i> 挿入を利用した環境ストレス応答性の改変		
(論文内容の要旨)			
<p>イネに見出された転移因子<i>mPing</i>は‘銀坊主’を含む一部の日本型品種で高い転移活性を有しており、1世代1個体あたり約40コピーの新規挿入が転移によって生じる。また、新規挿入の約10%は遺伝子の転写開始点上流約500bp以内に分布し、<i>mPing</i>配列上の複数のシス因子によって隣接遺伝子に環境ストレス応答性を付与することがある。したがって、銀坊主集団中には遺伝子直近への<i>mPing</i>挿入により環境ストレス応答性が改変された遺伝子が潜在していると考えられる。この中から環境ストレス耐性に関して有用な変異を効率的に抽出できれば、環境ストレス耐性育種に全く新しい素材を供給することができる。本論文では、<i>mPing</i>の新規挿入を直近のシス領域（転写開始点上流500bp以内）にもつ対立遺伝子（<i>mPing</i>::対立遺伝子）のストレス応答性について詳細に検討するとともに、<i>mPing</i>隣接配列データベースを利用した<i>mPing</i>::対立遺伝子の効率的なスクリーニング体系の構築を目的としている。</p>			
<p>1. 環境ストレス耐性関連遺伝子に対する<i>mPing</i>挿入効果を検討するため、銀坊主を11,520個体栽培して、8個体を1バルクとするDNAプール（葉身から抽出）と種子プール（1個体1穂）を作製した。DNAプールを用いて、PCR法により17個のストレス耐性関連遺伝子における<i>mPing</i>::対立遺伝子を検索した。その結果、5遺伝子座に<i>mPing</i>::対立遺伝子が認められた。対応する個体の自殖後代から得られた<i>mPing</i>挿入ホモ系統と不挿入ホモ系統を用いて低温および塩ストレス応答性の<i>mPing</i>挿入による変化を観察した結果、ZFP252以外では<i>mPing</i>挿入により塩および低温条件下での発現量が低下した。つまり、<i>mPing</i>挿入による本来の応答性に対する阻害効果が<i>mPing</i>内のシス因子による誘導効果よりも大きいと考えられた。</p>			
<p>2. PCR法による<i>mPing</i>::対立遺伝子の検出は、増幅が不確実であり遺伝子ごとにDNAプール全体の調査が必要になるなど必ずしも効率的ではなかった。この点を改めるため、<i>mPing</i>隣接配列（Franking sequence tags: FSTs）のデータベースを用いた<i>mPing</i>::対立遺伝子の抽出を試みた。DNAプールを12群に分けて、群ごとにFSTsのシークエンス・ライブラリーを調整して次世代シークエンサーによる塩基配列解析を行った。得られたFSTsデータをイネ・ゲノムにアライメントした結果、遺伝子内部および転写開始点上流500bp以内への挿入は、それぞれ9,095個および9,309個であった。この中から耐塩性を負に制御する遺伝子について<i>mPing</i>::対立遺伝子の効果を観察した結果、<i>mPing</i>挿入がストレス応答性を低下させたことにより塩ストレス下での生長速度が早くなる効果を認めた。一方、FSTsデータベースから無作為に選んだ33個の<i>mPing</i>::対立遺伝子のうち、DNAプールでは32個が検出できたが、種子プールで検出できたのは19個であった。これは、DNAプール作製時に葉身を用いたため、データベースには葉身特異的な挿入が多く含まれたためと考えられた。また、検出された新規挿入数が期待数の3分の1程度であったことから、シークエンス・ライブラリー調整時に偏りが生じていると考えられた。</p>			
<p>3. シークエンス・ライブラリー調整時の偏りを改善するため、新たに110,560個体の銀坊主集団を栽培した。まず、葉身特異的な挿入を排除するため、DNAプール作</p>			

製時に葉身ではなく種子プール作製に用いる穂の穂軸からDNAを抽出した。ライブラリー作製時の偏りの原因となる隣接する*mPing*間の増幅をsuppression PCRによって抑制するとともに、ランダムプライマーのランダム塩基数を8から15に増やした。その結果、Klenow fragmentを用いた低温でのアニーリング条件との組み合わせによって偏りの少ないライブラリー作製が可能であることを示した。

4. ライブラリー作製時の偏りを改善したデータベースをSTAmP (Spontaneous Transposition of Active element *mPing*) とした。転移因子挿入によるストレス応答性の改変が有用変異である確率は必ずしも高くはないが、STAmPデータベースから抽出できる極めて膨大な*mPing*::対立遺伝子のプールは有用変異の検索効率の向上に繋がると期待された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

転移因子の遺伝子領域内への挿入は宿主の遺伝子の機能欠損に直結し、多くの生物種では転移因子の活性を様々な機構で抑制している。イネの*mPing*は例外的に‘銀坊主’を含む少数の日本型イネ品種で高い転移活性を維持している。生物の進化の過程では転移因子は遺伝的変異創成に一定の役割を果たしてきており、大多数の遺伝子上流域には過去に転移した因子の効果が残っている。しかし、転移因子挿入が宿主の生育力やストレス耐性に及ぼす効果は偶然に左右され、多くの挿入は中立的か、むしろ負の効果を示す。このため、少数の転移因子挿入から実用的な変異を抽出して植物改良に利用することは現実的ではなかった。

本論文では、次世代シーケンサーを利用して構築したデータベースを利用することにより、銀坊主集団の中から*mPing*挿入により環境ストレス応答性が改変された可能性が高い対立遺伝子の検索を著しく効率化できることを示した。評価すべき点は以下のとおりである。

1. *mPing*挿入により環境ストレス耐性関連遺伝子はストレス応答性が低下するケースが多く、挿入は本来の転写因子の発現誘導効果を阻害するケースが多いことを明らかにした。
2. *mPing*挿入によって環境ストレス応答性が負に制御されることを利用すれば、環境ストレス応答性を低下させることで耐性付与に繋がる場合があることを示した。
3. 次世代シーケンサーを用いた*mPing*隣接配列のデータベース構築のためのライブラリー調整を最適化する方法を見出した。これにより、新たに育成した約1万個体の銀坊主集団から構築されるSTAmPデータベースには遺伝子上流に挿入された約22万個の*mPing*挿入サイトに関する情報が含まれると期待される。

以上のように、本論文は、イネ品種‘銀坊主’で特異的に転移活性が高い特異な転移因子を利用したストレス応答性の改変が可能であること、誘発された変異は新たなストレス耐性育種の遺伝的素材になりうること、*mPing*挿入部位を次世代シーケンサーの利用によりデータベース化すれば有用変異の効率的な検索が可能であることを明らかにした。これらは、イネの環境ストレス耐性に転移因子を利用して全く新しい育種素材を提供する途を拓くものであり、育種学、遺伝学、植物生理学、作物学、栽培学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成27年 2月10日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）